

川硬皮肿腿蜂携带松墨天牛致病菌的研究*

杨春平** 陶园媛** 向茂榕 杨 伟*** 杨 桦

(四川农业大学林学院森林保护实验室, 成都 611130)

摘 要 【目的】以生物导弹为理念, 应用寄生性昆虫携带病原物双重防治松墨天牛 *Monochamus alternatus* 是目前研究的新领域, 更是松材线虫病 *Bursaphelenchus xylophilus* 防治的新途径。【方法】本文以川硬皮肿腿蜂 *Scleroderma sichuanensis* 为载体, 通过测定 4 株松墨天牛致病菌的孢子粉和孢子悬浮剂对其毒力大小和川硬皮肿腿蜂对 4 株菌的 2 种剂型的初始携带量及存留量, 分析不同菌种与不同剂型对川硬皮肿腿蜂的影响和川硬皮肿腿蜂体表孢子脱落趋势。【结果】川硬皮肿腿蜂雌成蜂携带粉剂孢子的死亡率高于携带悬浮剂的, 但川硬皮肿腿蜂对粉剂孢子的携带量却远远高于悬浮剂孢子的携带量。当喷施孢子悬浮剂时, 川硬皮肿腿蜂的累计死亡率随浓度增加而增加, 同样携带量也随浓度增加而增加; 白僵菌对川硬皮肿腿蜂的毒力较绿僵菌高, 致死速率也较绿僵菌大, 但川硬皮肿腿蜂对白僵菌的携带效果却比绿僵菌的效果好。并且不论剂型和菌种, 川硬皮肿腿蜂体表的孢子在第 1d 后都脱落最为明显, 而后均保持较缓慢脱落。【结论】本研究证明川硬皮肿腿蜂携带松墨天牛致病菌的方法是可行的, 其中白僵菌孢子粉更适合携带。

关键词 川硬皮肿腿蜂; 白僵菌; 绿僵菌; 毒力测定; 携带能力

The potential for using *Scleroderma sichuanensis* as a vector for fungal pathogens of *Monochamus alternatus*

YANG Chun-Ping** TAO Yuan-Yuan** XIANG Mao-Rong YANG Wei*** YANG Hua

(Forest Conservation Laboratory of Forestry College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract 【Objectives】Based on the biological missile concept, the use of pathogen-carrying parasitic insects is potentially a new way of preventing and controlling both *Monochamus alternatus* and pine wilt disease. 【Methods】We measured the virulence of conidial powder and spore suspensions of four pathogenic fungal strains carried by *Scleroderma sichuanensis*, and the initial and residual pathogen load of each strain. We then analyzed the effects of each pathogenic strain and pathogen load on *S. sichuanensis*, and the shedding of pathogen spores on the body surface this species. 【Results】The mortality rate of females carrying conidial powder was higher than that of those infected with spore suspension, but the pathogen load of conidial powder was much higher than that of spore suspension. For suspensions, both the cumulative mortality and pathogen load of *S. sichuanensis* increased with increasing concentration. The virulence and the mortality rate induced by *Beauveria bassiana* was higher than that of *Metarhizium anisopliae*, but the pathogen load of *B. bassiana* was higher than that of *M. anisopliae*. Irrespective of dosage or strain, most spores on the body surface of *S. sichuanensis* fell off after the first day after which the rate of spore loss continued more slowly. 【Conclusion】*S. sichuanensis* is an effective vector of fungal pathogens of *M. alternatus*, particularly *B. bassiana*.

Key words *Scleroderma sichuanensis*; *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*; virulence determination; carrying capacity

松材线虫病 *Bursaphelenchus xylophilus* 被列 为重要的国际性检疫病害之一 (Zhao et al.,

*资助项目 Supported projects: 2018 年学科建设双支计划 (03573109)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 1595168790@qq.com; 1547333474@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: ywei0218@aliyun.com

收稿日期 Received: 2019-04-16; 接受日期 Accepted: 2020-06-04

2008; 何龙喜等, 2014), 有松树的“癌症”之称(杨宝君等, 2003; Rodrigues, 2009)。迄今, 学界公认的防治松材线虫病的主要途径仍是防治其媒介昆虫——松墨天牛 *Monochamus alternatus* (潘沧桑, 2011; 展茂魁等, 2014), 同时松墨天牛也是我国林业上的重要蛀干害虫(陈顺立, 2004; 曲良建等, 2014)。因此, 控制松墨天牛的危害十分重要和迫切。

目前, 利用生物防治的方法防治松墨天牛是其主要的研究方向和关键措施。天敌昆虫方面主要有川硬皮肿腿蜂 *Scleroderma sichuanensis* Xiao、管氏肿腿蜂 *Scleroderma guani*、花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides* 等(罗淋淋等, 2015; 朱诚棋等, 2017)。其中, 川硬皮肿腿蜂(简称川蜂)属膜翅目 Hymenoptera 肿腿蜂科 Bethyridae 天牛肿腿蜂属 *Scleroderma* (周祖基等, 1997; 周祖基, 1999), 具有搜索、攻击力强, 抗逆性强, 寄主范围广, 寄生率高, 繁殖力强, 发育周期短、能大规模繁殖等特点。作为一种优良寄生蜂, 川硬皮肿腿蜂对天牛等钻蛀性害虫有重大的生防价值, 已被广泛应用(赵正萍等, 2015)。病原微生物方面主要是用白僵菌 *Beauveria bassiana*、绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*、粉拟青霉 *Paecilomyces farinosus* 等病原真菌及粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescense*、苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* 等病原细菌(林倩男, 2017; 朱诚棋等, 2017)。其中, 白僵菌与绿僵菌的研究最为广泛, 应用最多。

由于病原真菌孢子与蛀干害虫较难有效接触, 天敌昆虫川蜂仅寄生天牛幼虫阶段(周祖基, 1999; 张翌楠和杨忠岐, 2006), 单独利用一种方法很难将松墨天牛的种群压低至经济容许水平以下。因此, 利用寄生性昆虫携带病原物双重防治松墨天牛是目前的研究趋势(陈晓明, 2013; 赵正萍等, 2015), 利用川蜂的主动搜索与病原菌致病相结合可能会发挥更好的作用。

要利用川硬皮肿腿蜂携带致病菌防治松墨天牛, 必需保证携带的病菌不会对川蜂有很强的毒力, 不会显著降低其寄主搜寻能力。本文利用川硬皮肿腿蜂携带天牛致病菌, 分析不同菌种与不同剂型对川硬皮肿腿蜂的影响和川硬皮肿腿蜂体表孢子脱落趋势, 为防治松墨天牛的菌种选择和剂型研发提供依据, 以期达到有效防治松墨天牛的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 试验所用菌株种类及来源详见表 1。

1.1.2 供试虫源 四川农业大学森保实验室提供的川硬皮肿腿蜂雌成虫。

1.2 方法

1.2.1 孢子悬浮液的配制 将上述 4 个菌株接种到 PDA 培养基上培养。待各菌株充分产孢后,

表 1 供试菌株
Table 1 Test bacterial strains

菌株 Bacterial strain	来源 Source
绿僵菌 1 号 <i>Metarhizium anisopliae</i> No.1	四川农业大学森保实验室提供的感染松墨天牛幼虫的绿僵菌 <i>M. anisopliae</i> from the larva of <i>M. alternatus</i> , which was provided by the Forest Conservation Laboratory of Sichuan Agricultural University
白僵菌 1 号 <i>Beauveria bassiana</i> No.1	四川农业大学森保实验室提供的感染松墨天牛幼虫的白僵菌 <i>B. bassiana</i> from the larva of <i>M. alternatus</i> , which was provided by the Forest Conservation Laboratory of Sichuan Agricultural University
绿僵菌 2 号 <i>Metarhizium anisopliae</i> No.2	西北农林科技大学提供的分离自松墨天牛幼虫的绿僵菌 <i>M. anisopliae</i> isolated from the larvae of <i>M. alternatus</i> was provided by Northwest Agriculture and Forestry University
白僵菌 2 号 <i>Beauveria bassiana</i> No.2	西北农林科技大学提供的分离自松墨天牛幼虫的白僵菌 <i>B. bassiana</i> isolated from the larvae of <i>M. alternatus</i> was provided by Northwest Agriculture and Forestry University

分别用无菌水将孢子洗入 100 mL0.1%的吐温 - 80 无菌水溶液中, 在磁力搅拌器上充分搅拌后, 配制成孢子悬浮液。在 400 倍显微镜下, 采用血球计数板计算孢子悬浮液浓度, 据悬浮液的初始浓度确定稀释倍数, 直到配成 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 cfu/mL 的菌液。

1.2.2 室内毒力测定 每个菌株作为一个处理, 选择大小一致、活泼的川蜂, 释放于喷有无菌水的滤纸上。采用两种方法进行川蜂室内毒力测定。一种方法是采用手持喷雾器将浓度为 1×10^6 、 1×10^7 和 1×10^8 cfu/mL 孢子悬浮液分别喷施在川蜂体上, 以所有川蜂被菌液完全打湿为宜。并将川蜂放入相应的组织培养瓶中。每个浓度设置 7 个重复, 每个重复选择 20 只川蜂。以喷施 0.1% 吐温 - 80 无菌水作为对照。另一种方法是将川蜂轻轻置于充分产孢的平板上, 任其自由爬行携带孢子粉。试验共设置 7 个重复, 每个重复每瓶 20 只川蜂。以不做任何处理的川蜂为对照。试验中, 每瓶投入消毒后的黄粉虫蛹以饲养川蜂, 并将其置于 $(25\pm1)^\circ\text{C}$ 、RH 70%-80% 的人工气候箱中, 每天观察并记录川蜂的死亡数, 计算平均死亡率。

1.2.3 携带能力测定 每个菌株作为一个处理, 挑选一定量的大小一致、活泼的川蜂, 分别采用上述 1.2.2 中的 2 种方法使川蜂带菌, 并置于人工气候箱中培养。培养 5 min、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d 后分别从瓶中挑选 20 只活泼的川

蜂, 将其置于 1 mL 0.1%吐温 - 80 无菌水中, 在旋涡振荡器上充分振荡使川蜂体表携带的孢子均匀分散在溶液中, 利用血球记数板计算悬浮液孢子浓度, 并换算成每蜂携带孢子量, 每个处理重复 3 次, 取平均值为川蜂携带的菌量。

1.2.4 数据处理 毒力测定的对照组死亡率在 5%-20%之间, 需用对照死亡率对试验死亡率进行校正, 得到校正死亡率。实验数据由 DPS 软件进行生物测定分析(唐启义和冯明光, 2002), 计算出致死中剂量 (LD_{50})。

校正死亡率 (%) =

$$\frac{(\text{实验组死亡率}-\text{对照组死亡率})}{(1-\text{对照组死亡率})}\times100$$

携带能力测定实验所得数据采用 Microsoft Office Excel 2010 和 SPSS19.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 川硬皮肿腿蜂的毒力测定

2.1.1 孢子悬浮液对川硬皮肿腿蜂的毒力 经不同种类孢子悬浮液处理后, 川蜂的生测结果见表 2。白僵菌 2 对川蜂的毒力最高, LD_{50} 为 7.213 8 cfu/mL; 其次是白僵菌 1, LD_{50} 为 8.594 1 cfu/mL; 毒力最低的为绿僵菌 2。各菌株毒力回归方程的斜率大小为: 白僵菌 2>白僵菌 1>绿僵菌 2>绿僵菌 1, 白僵菌 2 的斜率最大, 表明其致死速度最快。喷施各个菌株不同浓度孢子

表 2 4 种菌株孢子悬浮液对川蜂的毒力测定结果
Table 2 Test results of toxicity test of spore suspension from four pathogenic strains to *Scleroderma sichuanensis*

药剂名称 Name of the agent	毒力回归方程 Virulence regression equation	相关系数 <i>r</i> Correlation coefficient	标准误差 SE Standard error	LD_{50} 对数 (cfu/mL) LD_{50} logarithm	LD_{95} 对数 (cfu/mL) LD_{95} logarithm
绿僵菌 1 号 <i>M. anisopliae</i> No.1	$y=0.116\ 8x+3.502\ 1$	0.621 8	0.063 2	12.829 0	26.916 4
绿僵菌 2 号 <i>M. anisopliae</i> No.2	$y=0.128\ 8x+3.274\ 1$	0.697 9	0.071 6	13.401 5	26.173 7
白僵菌 1 号 <i>B. bassiana</i> No.1	$y=0.157\ 9x+3.643\ 0$	0.867 5	0.057 9	8.594 1	19.011 3
白僵菌 2 号 <i>B. bassiana</i> No.2	$y=0.163\ 2x+3.822\ 6$	0.879 2	0.053 7	7.213 8	17.292 1

表中数据的相关性 $P<0.05$, 并且相关系数 r 存在显著性的差异。
The correlation in the above data is $P<0.05$, and the correlation coefficient r is significantly different.

悬浮液的川蜂在人工气候箱中饲养 7 d 后的死亡情况见表 3, 可知 4 个菌株在浓度为 1×10^8 cfu/mL 时, 校正死亡率最高, 在浓度为 1×10^6 cfu/mL 时, 校正死亡率最低。

图 1 可知, 在 3 个菌种浓度下, 白僵菌的累计死亡率均比绿僵菌的高。从第 3 天开始, 经白僵菌侵染的川蜂累积死亡率的的增长速率变快, 且白僵菌 2 的累积死亡率高于白僵菌 1 的。而经绿僵菌侵染的川蜂从第 2 天开始累积死亡率的增长速率变快, 并且绿僵菌 1 与绿僵菌 2 累计死亡率的变化速率趋势一致, 直到第 7d 时累计死亡率趋于相同。综合表 1、表 2 和图 1 可知, 绿僵菌 1 和绿僵菌 2 的毒力相对较低。

2.1.2 孢子粉对川硬皮肿腿蜂的毒力 4 个菌株孢子粉处理川蜂 7 d 后的死亡情况表明 (表 4), 白僵菌 1 号处理后川蜂的死亡率最高, 其次是绿僵菌 1, 绿僵菌 2 和白僵菌 2 的死亡数最少且差异不显著。半致死时间 LT_{50} 从大到小为: 绿僵菌 1>白僵菌 2>绿僵菌 2>白僵菌 1, 可知白僵菌

1 致死速度最快, 绿僵菌 1 致死速度最慢。

从川蜂累计死亡率曲线图可知, 经绿僵菌 2 和白僵菌 2 处理的川蜂累计死亡率变化趋势一致 (图 2)。前 3d 经绿僵菌 2 和白僵菌 2 处理的川蜂累计死亡率大于其他菌株的, 第 3 天后经白僵菌 1 处理的川蜂累计死亡率大于其他 3 个菌株, 且增长趋势明显增大, 而其余 3 个菌株处理后的川蜂累计死亡率趋势接近, 增长缓慢。

综合表 3、表 4、图 1 和图 2, 发现经孢子粉处理后川蜂的死亡率要高于经孢子悬浮液处理后的, 且致死速度也相对较快。

2.2 川硬皮肿腿蜂携带能力测定

2.2.1 川硬皮肿腿蜂对不同剂型孢子的携带能力 对两种绿僵菌而言, 川蜂对其两种剂型孢子的初始携带量、各时间存留量之间均存在显著差异 ($P<0.05$); 对白僵菌 1 而言, 除第 1、2、4 天外, 川蜂对两种剂型孢子的初始携带量、各时间存留量之间均存在显著差异 ($P<0.05$); 对白

表 3 4 个菌株孢子悬浮液处理 7 d 后川蜂的校正死亡率
Table 3 Corrected mortality of *Scleroderma sichuanensis* treated with spore suspension of four pathogenic strains after 7 days

供试药剂 Name of the agent	浓度 (cfu/mL) Solution concentration	死亡虫数 Number of dead insects	死亡率 (%) Mortality	校正死亡率 (%) Adjusted mortality
绿僵菌 1 号 <i>M. anisopliae</i> No.1	1×10^6	1.875	9.38	- 0.689
	1×10^7	3.375	16.88	7.644
	1×10^8	9.000	45.00	38.890
	0	1.800	10.00	
绿僵菌 2 号 <i>M. anisopliae</i> No.2	1×10^6	1.714	8.57	2.041
	1×10^7	2.571	12.86	6.633
	1×10^8	7.571	37.86	33.418
	0	1.333	6.67	
白僵菌 1 号 <i>B. bassiana</i> No.1	1×10^6	4.429	22.14	11.859
	1×10^7	7.333	36.67	28.302
	1×10^8	12.000	60.00	54.717
	0	2.333	11.67	
白僵菌 2 号 <i>B. bassiana</i> No.2	1×10^6	7.000	35.00	23.529
	1×10^7	7.571	37.86	26.891
	1×10^8	14.286	71.43	66.386
	0	3.000	15.00	

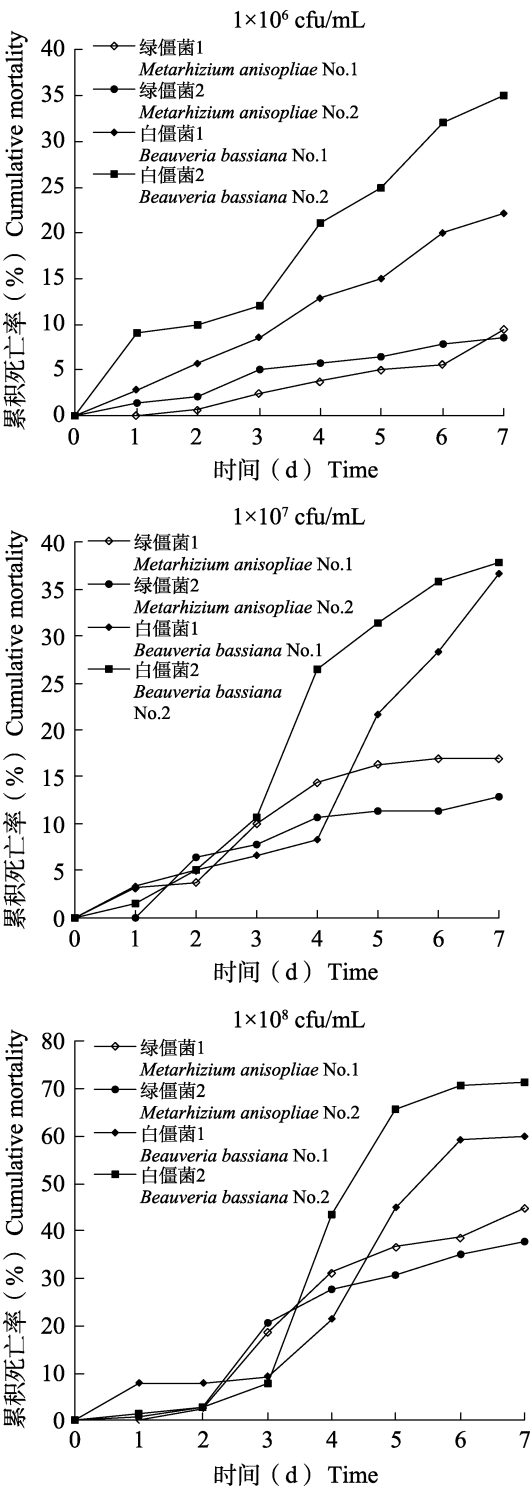


图 1 不同浓度孢子悬浮液处理川蜂的累计死亡率
Fig. 1 Cumulative mortality of *Scleroderma sichuanensis* treated with different concentrations of spore suspension of four pathogenic strains

僵菌 2 而言, 除第 1 天外, 川蜂对两种剂型孢子的初始携带量、各时间存留量之间均存在显著差

表 4 4 个菌株孢子粉处理 7 d 后川蜂的死亡情况
Table 4 The death status of *Scleroderma sichuanensis* treated with conidial powder of four pathogenic strains after 7 days

供试药剂 Name of the agent	死亡虫数 Number of dead insects	死亡率 (%) Mortality	LT ₅₀ (d)
绿僵菌 1 号 <i>M. anisopliae</i> No.1	9.25	46.25	5.77
绿僵菌 2 号 <i>M. anisopliae</i> No.2	8.14	40.71	5.11
白僵菌 1 号 <i>B. bassiana</i> No.1	19.43	97.14	4.84
白僵菌 2 号 <i>B. bassiana</i> No.2	8.14	40.71	5.35

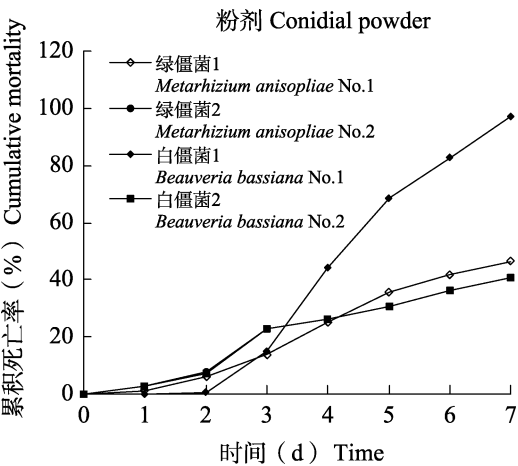


图 2 孢子粉处理川蜂的累计死亡率
Fig. 2 Cumulative mortality of *Scleroderma sichuanensis* treated with spore powder of four pathogenic strains

异 ($P<0.05$)。同时, 川蜂对这 4 株菌的孢子粉的携带量和存留量都远远大于悬浮剂的 (表 5-表 8)。川蜂对不同浓度孢子悬浮液的携带量如图 3 所示, 川蜂对这 4 株菌的初始携带量均随浓度增加而增加。除 1×10^6 cfu/mL 和 1×10^7 cfu/mL 的绿僵菌 2 在第 2 天孢子脱落量最大外, 川蜂携带的不同浓度的其余 3 株菌以及 1×10^8 cfu/mL 的绿僵菌 2 均都在第 1 天孢子脱落量最大, 且浓度越高脱落量越大。第 1 天以后, 川蜂携带的不同浓度的白僵菌 1、白僵菌 2 和 1×10^8 cfu/mL 的绿僵菌 1 孢子均保持缓慢脱落, 而 1×10^6 cfu/mL 和 1×10^7 cfu/mL 的绿僵菌 2 孢子在第 2 天后开始缓慢脱落, 同时所有菌株各浓度间的孢子存留量

表 5 川蜂携带绿僵菌 1 (孢子) 数量的日变化 ($\times 10^4$ 个/只)
Table 5 Diurnal variation in spores quantity of *Metarhizium anisopliae* No.1 carried by *Scleroderma sichuanensis* ($\times 10^4$ cfu/ind.)

携菌量的日变化 (d) Diurnal variation in quantity of fungus carried	悬浮剂浓度 (cfu/mL) The concentration of spore suspensions			孢子粉 Conidial powder
	1×10^6	1×10^7	1×10^8	
0	0.554 $\pm$ 0.05b	1.354 $\pm$ 0.05b	9.108 $\pm$ 0.69b	213.250 $\pm$ 5.75a
1	0.365 $\pm$ 0.02b	0.720 $\pm$ 0.03b	1.219 $\pm$ 0.22b	47.320 $\pm$ 7.18a
2	0.235 $\pm$ 0.02b	0.600 $\pm$ 0.03b	0.597 $\pm$ 0.09b	46.660 $\pm$ 8.96a
3	0.148 $\pm$ 0.03b	0.411 $\pm$ 0.01b	0.484 $\pm$ 0.03b	29.765 $\pm$ 0.87a
4	0.139 $\pm$ 0.04b	0.213 $\pm$ 0.09b	0.298 $\pm$ 0.02b	22.640 $\pm$ 2.94a
5	0.097 $\pm$ 0.02b	0.151 $\pm$ 0.05b	0.263 $\pm$ 0.01b	18.105 $\pm$ 2.21a
6	0.080 $\pm$ 0.01b	0.122 $\pm$ 0.01b	0.192 $\pm$ 0.01b	14.775 $\pm$ 0.95a
7	0.054 $\pm$ 0.01b	0.090 $\pm$ 0.01b	0.180 $\pm$ 0.01b	11.805 $\pm$ 1.65a

表中数据为平均值 $\pm$ 标准误, 同行数据后标有不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。下表同。

Data in the table are mean $\pm$ SE, and followed by different small letters within a row are significantly different at 0.05 level. The same below.

表 6 川蜂携带绿僵菌 2 (孢子) 数量的日变化 ($\times 10^4$ 个/只)
Table 6 Diurnal variation in spores quantity of *Metarhizium anisopliae* No.2 carried by *Scleroderma sichuanensis* ($\times 10^4$ cfu/ind.)

携菌量的日变化 (d) Diurnal variation in quantity of fungus carried	悬浮剂浓度 (cfu/mL) The concentration of spore suspensions			孢子粉 Conidial powder
	1×10^6	1×10^7	1×10^8	
0	0.505 $\pm$ 0.06b	1.244 $\pm$ 0.05b	7.513 $\pm$ 1.14b	155.950 $\pm$ 36.05a
1	0.365 $\pm$ 0.01b	0.865 $\pm$ 0.04b	0.831 $\pm$ 0.14b	45.188 $\pm$ 6.19a
2	0.103 $\pm$ 0.03b	0.463 $\pm$ 0.27b	0.608 $\pm$ 0.22b	32.700 $\pm$ 5.80a
3	0.092 $\pm$ 0.01b	0.331 $\pm$ 0.17b	0.550 $\pm$ 0.05b	26.250 $\pm$ 1.00a
4	0.060 $\pm$ 0.01b	0.302 $\pm$ 0.14b	0.446 $\pm$ 0.11b	23.715 $\pm$ 4.22a
5	0.058 $\pm$ 0.01b	0.200 $\pm$ 0.09b	0.225 $\pm$ 0.03b	19.170 $\pm$ 2.45a
6	0.040 $\pm$ 0.01b	0.124 $\pm$ 0.05b	0.200 $\pm$ 0.01b	14.870 $\pm$ 1.22a
7	0.029 $\pm$ 0.01b	0.123 $\pm$ 0.01b	0.175 $\pm$ 0.01b	11.540 $\pm$ 1.54a

表 7 川蜂携带白僵菌 1 (孢子) 数量的日变化 ($\times 10^4$ 个/只)
Table 7 Diurnal variation in spores quantity of *Beauveria bassiana* No.1 carried by *Scleroderma sichuanensis* ($\times 10^4$ cfu/ind.)

携菌量的日变化 (d) Diurnal variation in quantity of fungus carried	悬浮剂浓度 (cfu/mL) The concentration of spore suspensions			孢子粉 Conidial powder
	1×10^6	1×10^7	1×10^8	
0	1.493 $\pm$ 0.19b	5.472 $\pm$ 0.93b	27.610 $\pm$ 0.39b	237.900 $\pm$ 22.80a
1	0.765 $\pm$ 0.55a	1.026 $\pm$ 0.48a	2.854 $\pm$ 1.02a	78.865 $\pm$ 31.74a
2	0.705 $\pm$ 0.54a	0.969 $\pm$ 0.42a	1.778 $\pm$ 0.12a	58.903 $\pm$ 17.17a
3	0.661 $\pm$ 0.51b	0.687 $\pm$ 0.51b	1.136 $\pm$ 0.34b	51.250 $\pm$ 10.00a
4	0.531 $\pm$ 0.41a	0.663 $\pm$ 0.41a	1.128 $\pm$ 0.18a	40.565 $\pm$ 12.07a
5	0.432 $\pm$ 0.37b	0.625 $\pm$ 0.33b	1.238 $\pm$ 0.01b	39.500 $\pm$ 1.75a
6	0.288 $\pm$ 0.24b	0.433 $\pm$ 0.18b	1.025 $\pm$ 0.13b	37.875 $\pm$ 7.38a
7	0.213 $\pm$ 0.14b	0.267 $\pm$ 0.17b	1.063 $\pm$ 0.01b	35.290 $\pm$ 2.21a

表 8 川蜂携带白僵菌 2 (孢子) 数量的日变化 (×10⁴ 个/只)
Table 8 Diurnal variation in spores quantity of *Beauveria bassiana* No.2 carried by *Scleroderma sichuanensis* (×10⁴ cfu/ind.)

携菌量的日变化 (d) Diurnal variation in quantity of fungus carried	悬浮剂浓度 (cfu/mL) The concentration of spore suspensions			孢子粉 Conidial powder
	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸	
0	0.288±0.10c	3.411±0.01c	44.875±0.57b	189.745±0.76a
1	0.197±0.04a	0.475±0.03a	1.575±0.13a	77.425±22.58a
2	0.134±0.01b	0.344±0.08b	1.025±0.33b	78.200±20.20a
3	0.119±0.01b	0.238±0.04b	0.931±0.22b	50.315±6.19a
4	0.119±0.03b	0.253±0.05b	0.731±0.02b	42.113±1.64a
5	0.113±0.01b	0.175±0.01b	0.893±0.08b	39.500±0.25a
6	0.107±0.03b	0.164±0.02b	0.857±0.11b	34.945±6.06a
7	0.086±0.01b	0.137±0.03b	0.575±0.03b	31.650±7.06a

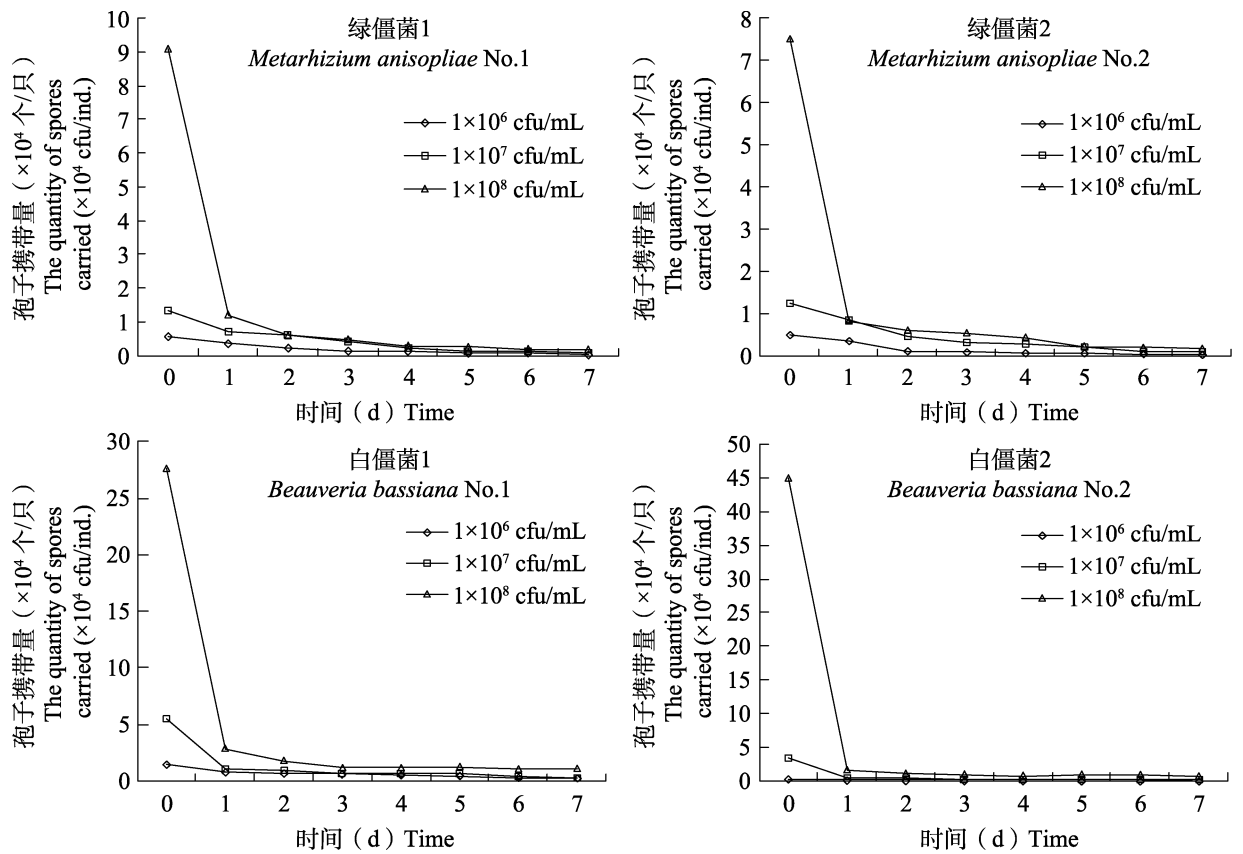


图 3 川蜂对不同浓度孢子悬浮液的携带量
Fig. 3 The carrying capacity of *Scleroderma sichuanensis* to different concentrations of spore suspensions

差异不显著。

2.2.2 川硬皮肿腿蜂对不同菌株孢子的携带能力 川蜂对 4 株菌粉剂孢子携带量的日变化见表 9。结果表明川蜂对 4 株菌的携带量无显著性差异。川蜂对这 4 株菌的初始携带量由

大到小为：白僵菌 1>绿僵菌 1>白僵菌 2>绿僵菌 2。

1 d 后，对绿僵菌 1、绿僵菌 2 而言，川蜂在活动中损失了约 70%的孢子；对白僵菌 1、绿僵菌 2 而言，川蜂在活动中损失了约 60%的孢

子, 损耗较大, 但仍然都维持着较高携带量。川蜂携带的绿僵菌 1、绿僵菌 2 孢子在第 3 天均脱落了 80% 以上, 白僵菌 1、白僵菌 2 孢子分别在第 4 天、第 6 天脱落了 80% 以上。川蜂携带的各

菌株孢子均在第 1 天后开始较缓慢脱落, 各菌株间差异不明显。总体看川蜂对这 4 株菌的整体携带能力从大到小为: 白僵菌 1>白僵菌 2>绿僵菌 1>绿僵菌 2 (图 4)。

表 9 川蜂携带粉剂孢子量的日变化 ($\times 10^4$ 个/只)

Table 9 Diurnal variation in spores quantity of conidial powder of different strains carried by *Scleroderma sichuanensis* ($\times 10^4$ cfu/ind.)

携菌量的日变化 (d) Diurnal variation in quantity of fungus carried	绿僵菌 1 <i>M. anisopliae</i> No.1	绿僵菌 2 <i>M. anisopliae</i> No.2	白僵菌 1 <i>B. bassiana</i> No.1	白僵菌 2 <i>B. bassiana</i> No.2
0	213.250 $\pm$ 5.75a	155.950 $\pm$ 36.05a	237.900 $\pm$ 22.80a	189.745 $\pm$ 0.76a
1	47.320 $\pm$ 7.18a	45.188 $\pm$ 6.19a	78.865 $\pm$ 31.74a	77.425 $\pm$ 22.58a
2	46.660 $\pm$ 8.96a	32.700 $\pm$ 5.80a	58.903 $\pm$ 17.17a	78.200 $\pm$ 20.20a
3	29.765 $\pm$ 0.87a	26.250 $\pm$ 1.00a	51.250 $\pm$ 10.00a	50.315 $\pm$ 6.19a
4	22.640 $\pm$ 2.94a	23.715 $\pm$ 4.22a	40.565 $\pm$ 12.07a	42.113 $\pm$ 1.64a
5	18.105 $\pm$ 2.21b	19.170 $\pm$ 2.45a	39.500 $\pm$ 1.75a	39.500 $\pm$ 0.25a
6	14.775 $\pm$ 0.95a	14.870 $\pm$ 1.22a	37.875 $\pm$ 7.38a	34.945 $\pm$ 6.06a
7	11.805 $\pm$ 1.65a	11.540 $\pm$ 1.54a	35.290 $\pm$ 2.21a	31.650 $\pm$ 7.06a

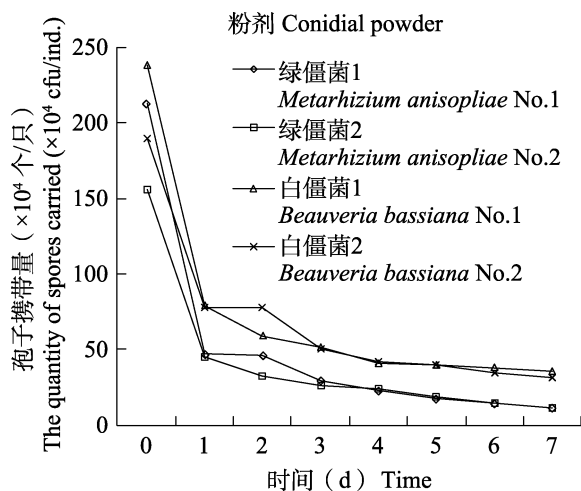


图 4 川蜂对 4 个菌株粉剂孢子的携带量

Fig. 4 The carrying capacity of *Scleroderma sichuanensis* to conidial powder of four pathogenic strains

川蜂对各浓度悬浮剂孢子携带量的日变化表明 (表 10, 表 11, 表 12), 在 3 个浓度下, 川蜂对 4 株菌的初始携带量都有显著差异 ($P<0.05$)。对 1×10^6 cfu/mL 来说, 川蜂对不同菌株的初始携带量从大到小为: 白僵菌 1>绿僵菌 1>绿僵菌 2>白僵菌 2, 且白僵菌 1 与其他 3 个菌株间存在显著差异 ($P<0.05$); 在 1×10^7 cfu/mL 下, 川蜂对不同菌株的初始携带量由大到小为: 白僵菌 1>白僵菌 2>绿僵菌 1>绿僵菌 2, 同样, 白僵

菌 1 与其他 3 个菌株间存在显著差异 ($P<0.05$); 在 1×10^8 cfu/mL 下, 川蜂对不同菌株的初始携带量从大到小为: 白僵菌 2>白僵菌 1>绿僵菌 1>绿僵菌 2, 两株绿僵菌与白僵菌间差异显著 ($P<0.05$), 两株绿僵菌之间差异不明显, 而白僵菌之间差异显著 ($P<0.05$)。当携带菌第 7 天时, 川蜂对浓度为 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 cfu/mL 的最终携带量从大到小顺序分别为: 白僵菌 1>白僵菌 2>绿僵菌 1>绿僵菌 2、白僵菌 1>白僵菌 2>绿僵菌 2>绿僵菌 1、白僵菌 1>白僵菌 2>绿僵菌 1>绿僵菌 2。

以上结果表明, 川蜂对白僵菌的整体携带量高于绿僵菌的, 且对白僵菌 1 携带量最高 (图 5)。第 1 天川蜂携带白僵菌的孢子脱落量明显大于绿僵菌脱落量, 且经高浓度悬浮液处理的脱落量大于低浓度处理。随携带天数的增加, 在浓度为 1×10^6 cfu/mL 和 1×10^7 cfu/mL 菌株中, 川蜂对各菌株携带量无显著差异, 均保持较缓慢脱落。而菌株浓度为 1×10^8 cfu/mL 时各菌株孢子虽也都保持较缓慢脱落, 但携带量存在显著差异 ($P<0.05$)。总体趋势是川蜂对白僵菌携带量明显高于对绿僵菌的携带量, 而对绿僵菌 1 和绿僵菌 2 的携带量无明显差别, 对白僵菌 1 和白僵菌 2 的携带量差异显著 ($P<0.05$)。

表 10 川蜂携带 1×10^6 cfu/mL 悬浮剂的孢子数量日变化 ($\times 10^4$ 个/只)
Table 10 Diurnal variation in spores quantity of spore suspensions with a concentration of 1×10^6 cfu/mL carried by *Scleroderma sichuanensis* ($\times 10^4$ cfu/ind.)

携菌量的日变化 (d) Diurnal variation in quantity of fungus carried	绿僵菌 1 <i>M. anisopliae</i> No.1	绿僵菌 2 <i>M. anisopliae</i> No.2	白僵菌 1 <i>B. bassiana</i> No.1	白僵菌 2 <i>B. bassiana</i> No.2
0	0.554±0.05b	0.505±0.06b	1.493±0.19a	0.288±0.10b
1	0.365±0.02a	0.365±0.01a	0.765±0.55a	0.197±0.04a
2	0.235±0.02a	0.103±0.03a	0.705±0.54a	0.134±0.01a
3	0.148±0.03a	0.092±0.01a	0.661±0.51a	0.119±0.01a
4	0.139±0.04a	0.060±0.01a	0.531±0.41a	0.119±0.03a
5	0.097±0.02a	0.058±0.01a	0.432±0.37a	0.113±0.01a
6	0.080±0.01a	0.040±0.01a	0.288±0.24a	0.107±0.03a
7	0.054±0.01a	0.029±0.01a	0.213±0.14a	0.086±0.01a

表 11 川蜂携带 1×10^7 cfu/mL 悬浮剂的孢子数量日变化 ($\times 10^4$ 个/只)
Table 11 Diurnal variation in spores quantity of spore suspensions with a concentration of 1×10^7 cfu/mL carried by *Scleroderma sichuanensis* ($\times 10^4$ cfu/ind.)

携菌量的日变化 (d) Diurnal variation in quantity of fungus carried	绿僵菌 1 <i>M. anisopliae</i> No.1	绿僵菌 2 <i>M. anisopliae</i> No.2	白僵菌 1 <i>B. bassiana</i> No.1	白僵菌 2 <i>B. bassiana</i> No.2
0	1.354±0.05b	1.244±0.05b	5.472±0.93a	3.411±0.01ab
1	0.720±0.03a	0.865±0.04a	1.026±0.48a	0.475±0.03a
2	0.600±0.03a	0.463±0.27a	0.969±0.42a	0.344±0.08a
3	0.411±0.01a	0.331±0.17a	0.687±0.51a	0.238±0.04a
4	0.213±0.09a	0.302±0.14a	0.663±0.41a	0.253±0.05a
5	0.151±0.05a	0.200±0.09a	0.625±0.33a	0.175±0.01a
6	0.122±0.01a	0.124±0.05a	0.433±0.18a	0.164±0.02a
7	0.090±0.01a	0.123±0.01a	0.267±0.17a	0.137±0.03a

表 12 川蜂携带 1×10^8 cfu/mL 悬浮剂的孢子数量日变化 ($\times 10^4$ 个/只)
Table 12 Diurnal variation in spores quantity of spore suspensions with a concentration of 1×10^8 cfu/mL carried by *Scleroderma sichuanensis* ($\times 10^4$ cfu/ind.)

携菌量的日变化 (d) Diurnal variation in quantity of fungus carried	绿僵菌 1 <i>M. anisopliae</i> No.1	绿僵菌 2 <i>M. anisopliae</i> No.2	白僵菌 1 <i>B. bassiana</i> No.1	白僵菌 2 <i>B. bassiana</i> No.2
0	9.108±0.69c	7.513±1.14c	27.610±0.39b	44.875±0.57a
1	1.219±0.22a	0.831±0.14a	2.854±1.02a	1.575±0.13a
2	0.597±0.09a	0.608±0.22a	1.778±0.12a	1.025±0.33a
3	0.484±0.03a	0.550±0.05a	1.136±0.34a	0.931±0.22a
4	0.298±0.02b	0.446±0.11ab	1.128±0.18a	0.731±0.02ab
5	0.263±0.01c	0.225±0.03c	1.238±0.01a	0.893±0.08b
6	0.192±0.01b	0.200±0.01b	1.025±0.13a	0.857±0.11a
7	0.180±0.01c	0.175±0.01c	1.063±0.01a	0.575±0.03b

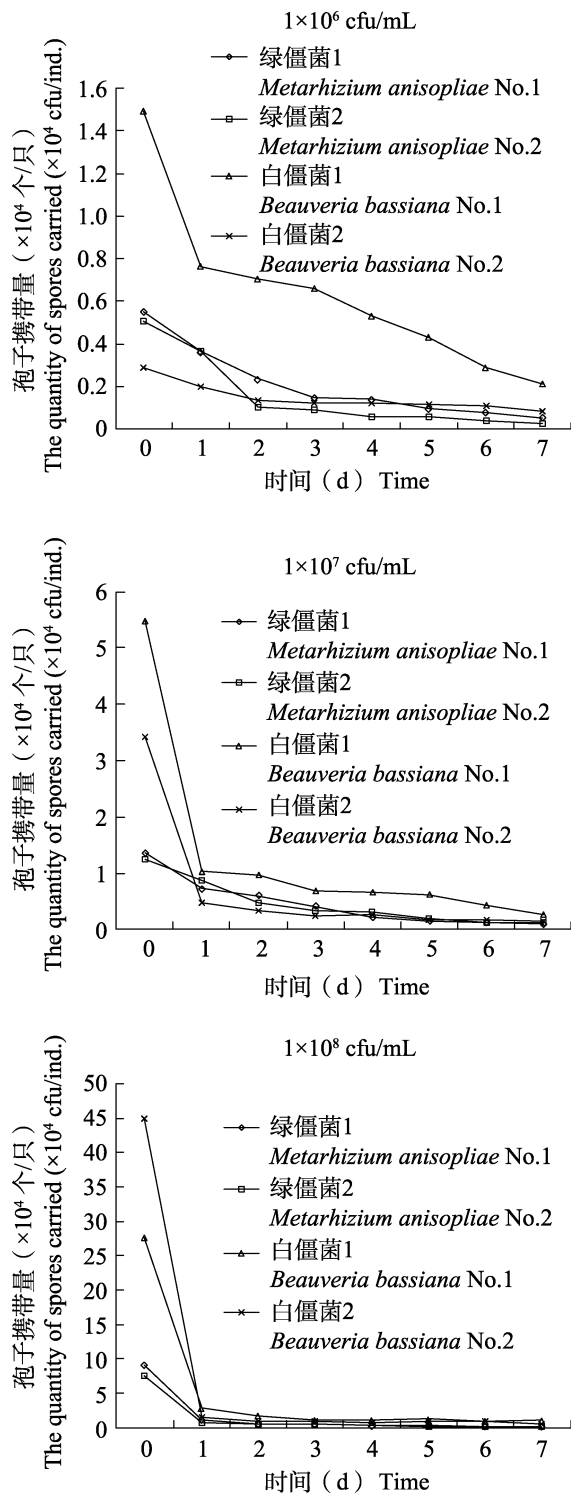


图5 川蜂对4个菌株的悬浮剂孢子的携带量

Fig. 5 Carrying capacity of *Scleroderma sichuanensis* to spore suspensions of four pathogenic strains

3 讨论

利用载体昆虫携带病原物是害虫生物防治

的新途径,可提高对隐蔽生活的害虫或常规措施难以防治的有害生物的防治效果,虽然目前该方面研究时间较短,范围较窄,但具有较好的研究开发前景。如 Butt 等(1998)利用西方蜜蜂 *Apis mellifera* 携带绿僵菌来控制油菜露尾甲 *Meligethes aeneus*,提高了害虫的死亡率。Kapongo 等(2008)利用熊蜂 *Bombus impatiens* 携带白僵菌来控制温室番茄上的温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*、温室甜椒上的美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* 和桃蚜 *Myzus persicae*,均取得了良好的防治效果。刘洪剑等(2007)、潘永胜等(2009)利用管氏肿腿蜂携带白僵菌或绿僵菌防治松墨天牛均提高了防治效果。其中,病原菌对载体昆虫的毒力及携菌方式是利用此方法进行生物防治可行的前提因素。

室内毒力及携带试验表明川硬皮肿腿蜂对这4株菌的不同剂型孢子的携带能力不同,粉剂携带量远远高于悬浮剂携带量,就悬浮剂而言,携带量随浓度增加而增加。同样,粉剂孢子对川蜂的毒力整体来看相对较高于悬浮剂孢子,就悬浮剂而言,毒力随浓度增加而增加。但其中川蜂在白僵菌2号孢子粉处理下的死亡率低于 1×10^8 cfu/mL 悬浮剂的,这与陈晓明(2013)利用隐翅虫携带白僵菌、杨毅(2005)利用川蜂携带白僵菌所测结果相似。而剩余3个菌株与之不同,推测可能与菌种和初始携带量不同有关。本实验中,川蜂对悬浮剂孢子的初始携带量较低,可能是因川蜂被水珠所困,造成行动不便,因而用力摆脱粘在身上的水珠,因此喷施孢子悬浮剂的方法不适宜在野外采用,这与胡中成等(2007)结论相似。而爬过法能使孢子很轻易地黏附在川蜂身上,单只川蜂初始携带量非常高,可达 10^6 的数量级,1 d后川蜂体表孢子脱落了70%以上,3 d后孢子脱落量达80%以上,一周后仍维持了较高的携带量,达 10^5 的数量级。同时,川蜂携带除白僵菌1外的3个菌株孢子粉7 d后的死亡率均小于50%,且 LT_{50} 约为5 d,因此7 d的时间对川蜂搜索到寄主已经足够了,并且在川蜂搜索途径中散落的孢子,可能在野外成为潜在的致病因子。

川蜂对不同菌株的携带能力也不同, 白僵菌的携带效果比绿僵菌效果好, 白僵菌和绿僵菌中均为 1 号携带量最高。白僵菌 1 和绿僵菌 1 均来自感病的天牛虫体, 且观察平板可知, 白僵菌菌落孢子的黏结程度比绿僵菌孢子的黏结程度高, 绿僵菌孢子易散落。而毒力试验中以孢子粉的方式携菌, 白僵菌 1、绿僵菌 1 的毒力也是相对白僵菌 2、绿僵菌 2 较高些, 这说明川蜂对不同菌株的携带能力和不同菌株对川蜂的毒力可能跟菌种来源和黏度有关, 直接来源于感病天牛虫体的菌种更适合携带但毒力也相对较大, 黏度越高川蜂携带的孢子越不易脱落但毒力也相对较大。

利用川硬皮肿腿蜂作为天牛致病菌的载体, 进行生物防治的研究甚少。胡中成等 (2007) 的携带试验只采用了白僵菌孢子粉处理的方法, 且仅测定了第 1、3、7d 的川蜂体壁孢子的残留量, 其残留量与本实验比偏低。而本实验对川硬皮肿腿蜂携带的 2 种天牛致病菌孢子的存留情况进行了更为细致的测定和比较。总体而言, 不论剂型和菌种, 川蜂在第 1d 后体表的孢子都较大量脱落, 而后均保持较缓慢脱落。

综上所述, 本研究表明川硬皮肿腿蜂携带天牛致病菌的方法是可行的, 白僵菌孢子粉携带量最高, 其中来源于感病天牛虫体的白僵菌即白僵菌 1 号携带量最高, 但毒力也相对较高, 因此白僵菌 2 号更适合携带。在川硬皮肿腿蜂对天牛致病菌有一定携带量且毒力适宜的基础上, 进一步对菌种和剂型的成分进行改进, 添加适宜的助剂, 降低对川蜂的毒力, 增加病原物对载体昆虫的黏附力, 延长其携带时间, 以提高川蜂携带和传播病原物的效率, 是今后的研究重点。因此对于剂型和菌种的开发进行深入研究, 可为川蜂携带菌防治松墨天牛奠定良好基础, 有利于提高生物防治的实施效果。

参考文献 (References)

- Butt TM, Carreck NL, Ibrahim L, Williams IH, 1998. Honey-bee-mediated infection of pollen beetle (*Meligethes aeneus* Fab.) by the insect-pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 8(4): 533–538.
- Chen SL, Lin QY, Hang JC, 2004. Integrated Pest Management of Main Tree Species in Southern China. Xiamen: Xiamen University Press. 160. [陈顺立, 林庆源, 黄金聪, 2004. 南方主要树种害虫综合管理. 厦门: 厦门大学出版社. 160.]
- Chen XM, 2013. Researches on the control technology of *Monochamus alternatus* by use of entomopathogenic fungi carried by rove beetle. Masteral dissertation. Nanjing: Nanjing Forestry University. [陈晓明, 2013. 利用隐翅虫携带病原菌防治松墨天牛技术研究. 硕士学位论文. 南京: 南京林业大学.]
- He LX, Ji J, Qiu XW, Zhang LP, 2014. General situation and control measures of pine wilt disease in the world. *Journal of Forestry Engineering*, 28(3): 8–13. [何龙喜, 吉静, 邱秀文, 张林平, 2014. 世界松材线虫病发生概况及防治措施. 林业科技开发, 28(3): 8–13.]
- Hu ZC, Yang Y, Ma LJ, Sun ST, 2007. Experiment on *Monochamus alternatus* infected by *Beauveria bassiana* carried by *Scleroderma sichuanensis*. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 27(3): 48–50. [胡中成, 杨毅, 马良进, 孙素婷, 2007. 川硬皮肿腿蜂携带白僵菌主动传染松墨天牛探索试验. 浙江林业科技, 27(3): 48–50.]
- Kapongo JP, Shipp L, Kevan P, Broadbent B, 2008. Optimal concentration of *Beauveria bassiana* vectored by bumble bees in relation to pest and bee mortality in greenhouse tomato and sweet pepper. *BioControl*, 53(5): 797–812.
- Lin QN, 2017. Isolation and identification of potential pathogenic bacteria from *Monochamus alternatus* Hope and their bacterial diversity in associated habitats. Masteral dissertation. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University. [林倩男, 2017. 松墨天牛潜在病原细菌的分离鉴定及其与关联生境的细菌多样性. 硕士学位论文. 福建: 福建农林大学.]
- Liu HJ, Piao CG, Wang LF, Shen XZ, Zheng RZ, Shu QL, 2007. Biocontrol of *Monochamus alternatus* by *Beauveria bassiana* and *Scleroderma guani*. *Scientia Silvae Sinicae*, 43(5): 64–68. [刘洪剑, 朴春根, 汪来发, 申相澈, 郑荣镇, 束庆龙, 2007. 白僵菌和肿腿蜂对松墨天牛幼虫的作用. 林业科学, 43(5): 64–68.]
- Luo LL, Cai ZL, Lin T, 2015. Research progress on natural enemies against *Monochamus alternates* Hope and its bio-control. *China Plant Protection*, 35(2): 21–25. [罗淋淋, 蔡紫玲, 林同, 2015. 松墨天牛的天敌生防利用研究进展. 中国植保导刊, 35(2): 21–25.]
- Pan CS, 2011. Advances in research on pine wilt disease. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 50(2): 476–483. [潘沧桑, 2011. 松材线虫病研究进展. 厦门大学学报(自然科学版), 50(2): 476–483.]
- Pan YS, Xu FY, Han ZM, 2009. Controlling on *Monochamus alternatus* larva with *Scleroderma guani* and carried fungus.

- Journal of Jiangsu Forestry Science and Technology*, 36(2): 11–14. [潘永胜, 徐福元, 韩正敏, 2009. 管氏肿腿蜂及其带菌室内防治松褐天牛幼虫研究. *江苏林业科技*, 36(2): 11–14.]
- Qu LJ, Wang LJ, Wang QH, Wang YZ, Zhang YA, 2014. Comparison of the quality of genomic DNA extracted from adult specimens of *Monochamus alternatus* preserved by different methods. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(3): 741–748. [曲良建, 王丽娟, 王青华, 王玉珠, 张永安, 2014. 松墨天牛成虫标本保存及其 DNA 提取质量比较. *应用昆虫学报*, 51(3): 741–748.]
- Rodrigues JM, 2009. Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems. *Nematology*, 11(2): 5–14.
- Tang QY, Feng MG, 2002. Practical Statistical Analysis and its DPS Data Processing System. Beijing: Science Press. 188–195. [唐启义, 冯明光, 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社. 188–195.]
- Yang BJ, Pan HY, Tang J, Wang YY, Wang LF, 2003. Pine Wilt Disease. Beijing: China Forestry Press. 1–7. [杨宝君, 潘宏阳, 汤坚, 王玉嫵, 汪来发, 2003. 松材线虫病. 北京: 中国林业出版社. 1–7.]
- Yang Y, 2005. Study on screening superior strain of *Beauveria bassiana* to *Monochamus alternates* and exploring the mechanism diffused voluntarily by *Scleroderma sichuanensis* Xiao. Masteral dissertation. Sichuan: Sichuan Agriculture University. [杨毅, 2005. 寄生松墨天牛的白僵菌优良菌株筛选及利用肿腿蜂带菌主动传染机制的探索. 硕士学位论文. 四川: 四川农业大学.]
- Zhan MK, Yang ZQ, Wang XY, Lai YX, Zhang YF, 2014. Capacity of transmitting *Bursaphelenchus xylophilus* by the vector *Monochamus alternatus* adults. *Scientia Silvae Sinicae*, 50(7): 74–81. [展茂魁, 杨忠岐, 王小艺, 来燕学, 张毅丰, 2014. 松褐天牛成虫松材线虫病的传播能力. *林业科学*, 50(7): 74–81.]
- Zhang YN, Yang ZQ, 2006. Studies on the natural enemies and biocontrol of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *Plant Protection*, 32(2): 9–14. [张翌楠, 杨忠岐, 2006. 松褐天牛的天敌及其对寄主的控制能力研究. *植物保护*, 32(2): 9–14.]
- Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y, 2008. Pine Wilt Disease. Tokyo: Springer. 1–36.
- Zhao ZP, Ji BZ, Liu SW, 2015. Research progress of biological control by use of insects to deliver pathogens. *Journal of Nanjing Forestry University*, 39(2): 155–162. [赵正萍, 嵇保中, 刘曙雯, 2015. 利用昆虫携带病原物实施生物防治的研究进展. *南京林业大学学报*, 39(2): 155–162.]
- Zhou ZJ, 1999. A summary of the research on *Scleroderma sichuanensis* Xiao. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*, 20(3): 59–61. [周祖基, 1999. 川硬皮肿腿蜂研究概述. *四川林业科技*, 20(3): 59–61.]
- Zhou ZJ, Yang W, Zeng CH, Yang DM, Ye WJ, 1997. Study on the biological characteristics of *Scleroderma sichuanensis* Xiao. *Scientia Silvae Sinicae*, 33(5): 475–479. [周祖基, 杨伟, 曾垂惠, 杨德敏, 叶伟军, 1997. 川硬皮肿腿蜂生物学特性的研究. *林业科学*, 33(5): 475–479.]
- Zhu CQ, Wang B, Shen J, Mou J, Qin WQ, Wen XJ, 2017. Research progress on integrated controlling techniques against *Monochamus alternatus*. *China Plant Protection*, 37(2): 19–24. [朱诚棋, 王博, 沈婧, 牟静, 秦文权, 温秀军, 2017. 松墨天牛综合防治进展. *中国植保导刊*, 37(2): 19–24.]